

单纯疱疹病毒 2 型糖蛋白 G 的表达、纯化及鉴定

彭杰雄¹, 黄涛², 林连成³, 邵永红⁴

(1. 中国人民武装警察部队广东省边防总队医院检验科, 广东 深圳 518029; 2. 深圳市赛芯生物技术研究所;
3. 深圳市赛尔生物技术有限公司; 4. 深圳大学光电工程学院)

摘要: 目的 对 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒进行诱导表达, 并纯化、鉴定表达的目的蛋白。方法 用最佳诱导条件对重组质粒进行诱导表达, 表达产物经 SDS-PAGE 电泳检测验证后, 对存在于超声离心上清液中的融合蛋白用亲和层析技术进行纯化, 并用 ELISA 间接法对纯化的 GST/gG-2 融合蛋白的灵敏性和特异性等生物活性进行鉴定。结果 目的蛋白经诱导后表达于上清中, 经鉴定纯化的目的蛋白保留了天然蛋白原有的生物活性。结论 GST/gG-2 融合蛋白的获得, 为研制以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的新型 HSV-2 型特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

关键词: 单纯疱疹病毒; 糖蛋白 G; 表达; 纯化; 鉴定

中图分类号: R752.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2012)18-4785-03

Purification, identification and expression of GST/gG-2 Protein

PENG Jie-xiong*, HUANG Tao, LIN Lian-cheng, SHAO Yong-hong.

*Department of Laboratory Medicine, Frontier Corps Hospital of People's Armed Police, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: **OBJECTIVE** To induce the pGEX-4T-1/gG-2, then purify and identify the expression of protein. **METHODS** The recombinant plasmid was induced with the optimum condition, then the expressed production was identified by SDS-PAGE. The recombinant strain was analyzed by ultrasonic wave and harvested by centrifugation. Then the supernatant was purified by affinity chromatography, the sensitivity and specificity of GST/gG-2 protein was identified by indirect ELISA. **RESULTS** The interest protein was in the supernatant, and it remains the biological activity of native protein. **CONCLUSION** The successful expression of GST/gG-2 protein lays a good foundation for the research of new type-specific serological detection of HSV-2.

Key words: Herpes Simplex Virus; gG; Expression; Purification; Identification

单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 属于疱疹病毒科 α 疱疹病毒亚科, 是 TORCH 综合症的病原体之一, 根据抗原性的差别分为 HSV-1 和 HSV-2 两种血清型。

在目前已发现并正式命名的 HSV 12 种^[1]包膜糖蛋白中, 糖蛋白 G (glycoprotein G, gG) 是 HSV-1 与 HSV-2 型间差异最大的一个糖蛋白, 是抗 HSV 体液免疫应答的主要靶位, 可诱导机体产生型特异性抗体反应^[2], 是 HSV 型特异性免疫学检测的最佳抗原^[3]。gG 作为型特异性抗原, 在免疫学检测及疫苗研制方面的应用前景已引起广泛关注^[4-7]。文中对由深圳市赛芯生物技术研究所构建并鉴定的 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒^[8], 进行了目的蛋白的诱导表达, 随后进行了亲和纯化及活性鉴定, 为下一步研制 HSV-2 型特异性免疫学检测试剂盒奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目: 深圳市罗湖区软科学研究计划资助项目 (2010 89); 深港创新圈计划资助项目 (ZYB200907090128A)

作者简介: 彭杰雄 (1961-), 男, 学士, 副主任技师, 研究方向: 临床检验

通讯作者: 黄涛, E-mail: taoshengyijiu929@yahoo.com.cn

含 pGEX-4T-1 载体质粒的基因工程菌 BL₂₁ (DE₃), 由深圳市赛芯生物技术研究所保存; 含 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒的基因工程菌 BL₂₁ (DE₃), 由深圳市赛芯生物技术研究所构建并保存; Protein Molecular Weight Marker (Middle-Range), 购自 BBI 公司; 蛋白质分子量标准 (宽), 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; “High-Affinity GST Resin (L00207)” 试剂盒, 购自 Gen Script 公司; HRP 标记鼠抗人 IgG 单抗, 由深圳市赛芯生物技术研究所制备; 94 份临床血清样本, 由中国人民武装警察部队广东省边防总队医院检验科收集; “Captia™ HSV 1 Type Specific IgG” 和 “Captia™ HSV 2 Type Specific IgG” 试剂盒, 均购自 Trinity 公司; ST-360 酶标仪, 购自上海市科华实验系统有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的诱导表达 分别将转化有 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒和 pGEX-4T-1 载体质粒的大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃), 以确立的最佳诱导条件 ($A_{600} = 0.5 \sim 0.7$ 、IPTG 终浓度为 1 mmol/L、37°C 诱导培养 4 h) 进行目的蛋白的诱导表达, 产物经 12% SDS-PAGE 电泳, 观察蛋白表达情况。

1.2.2 表达产物的存在形式 将诱导后的菌液以冰浴超声波法^[9]进行细菌破碎, 超声离心后上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳, 确立目的蛋白的表达形式。

1.2.3 表达产物的纯化 在证实目的蛋白均以可溶性形式表达

后,以 Gen Script 公司的“High-Affinity GST Resin (L00207)”试剂盒,用亲和层析技术^[10],对存在于上清中的目的蛋白进行纯化。

1.2.4 对照血清的确立 分别用“Captia™ HSV 1 Type Specific IgG”和“Captia™ HSV 2 Type Specific IgG”试剂盒对 94 份临床血清样本进行双重检测,检测方法、结果判定按说明书严格执行,最后将检测结果叠加,以确认血清属性(对结果可疑样本进行二次重复检测)。

1.2.5 重组蛋白的活性鉴定 分别用纯化的 GST/gG-2 融合蛋白和 GST 蛋白作包被抗原,以确立的最佳反应模式(蛋白包被浓度为 50 ng/孔、HRP 标记鼠抗人 IgG 单抗浓度为 1:4 000),用 ELISA 间接法对 94 份对照血清进行检测,分析重组蛋白生物活性。

2 结果

2.1 重组质粒的诱导表达及纯化

经 12% SDS-PAGE 电泳发现,含 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒的 BL₂₁ (DE₃) 经诱导后表达相对分子质量约为 40 kD 的 GST/gG-2 融合蛋白(见图 1),含 pGEX-4T-1 载体质粒的 BL₂₁ (DE₃) 经诱导后表达相对分子质量约为 26 kD 的 GST 蛋白(见图 2),与预期结果相符;GST/gG-2 融合蛋白和 GST 蛋白均以可溶性蛋白形式存在于超声离心后的上清中(见图 1、图 2);GST/gG-2 融合蛋白和 GST 蛋白经亲和纯化后蛋白纯度极高,几乎无杂蛋白存在(见图 1、图 2)。

2.2 参考血清的筛选

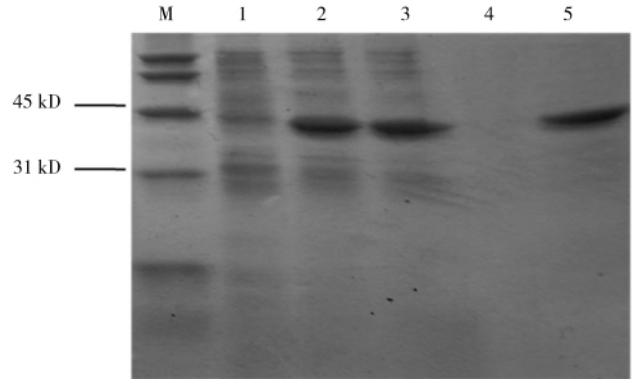
94 份临床血清样本,经“Captia™ HSV 1 Type Specific IgG”试剂盒检测,阳性结果 69 份、阴性结果 25 份;经“Captia™ HSV 2 Type Specific IgG”试剂盒检测,阳性结果 27 份、阴性结果 67 份。将检测结果叠加,得 HSV-1⊕ & HSV-2⊕ 对照血清 22 份、HSV-1⊕ & HSV-2⊖ 对照血清 47 份、HSV-1⊖ & HSV-2⊖ 对照血清 20 份、HSV-1⊖ & HSV-2⊕ 对照血清 5 份(检测具体数据未列出)。

2.3 重组蛋白的活性鉴定

经检测 A1~B10 结果吻合 18 份、B11~F9 结果吻合 42 份、F10~H5 结果吻合 20 份、H6~H10 结果吻合 4 份。GST/gG-2 融合蛋白作为检测抗原的灵敏度 = (A1~B10 中的结果吻合份数+H6~H10 中的结果吻合份数) / (A1~B10 +H6~H10) ×100% = (18+4) / (22+5) ×100% = 81.48%; 特异性 = (B11~F9 中的

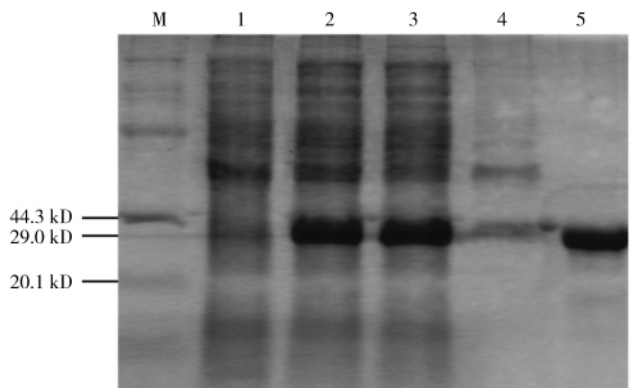
结果吻合份数+ F10~H5 中的结果吻合份数) / (B11~F9+ F10~H5) ×100% = (42+20) / (47+20) ×100% = 92.54%。

GST 蛋白对 94 份对照血清用同样条件进行检测,结果均阴性(检测具体数据未列出)。见表 1。



注: M. Protein Molecular Weight Marker; 1.未诱导的 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒; 2.诱导的 pGEX-4T-1/gG-2 重组质粒; 3.超声裂解诱导产物的离心上清; 4.超声裂解诱导产物的离心沉淀; 5.纯化后的 GST/gG-2 融合蛋白。

图 1 重组质粒表达、纯化的 SDS-PAGE 分析



注: M. 蛋白质分子量标准(宽); 1.未诱导的 pGEX-4T-1 载体质粒; 2.诱导的 pGEX-4T-1 载体质粒; 3.超声裂解诱导产物的离心上清; 4.超声裂解诱导产物的离心沉淀; 5.纯化后的 GST 蛋白。

图 2 载体质粒表达、纯化的 SDS-PAGE 分析

表 1 GST/gG-2 融合蛋白对 94 份对照血清的检测结果

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.696	0.667	2.105	1.582	0.966	0.645	0.942	2.038	1.569	0.680	0.535	1.005
B	0.094	0.333	0.127	0.206	0.854	0.200	0.491	0.474	1.082	0.447	0.101	0.167
C	0.074	0.106	0.150	0.084	0.048	0.121	0.053	0.031	0.057	0.093	0.064	0.059
D	0.114	0.100	0.100	0.100	0.088	0.084	0.435	0.056	0.157	0.259	0.102	0.023
E	0.101	0.074	0.031	0.024	0.108	0.031	0.063	0.166	0.073	0.097	0.150	0.065
F	0.092	0.094	0.010	0.300	0.055	0.270	0.241	0.076	0.119	0.130	0.106	0.103
G	0.118	0.022	0.048	0.054	0.063	0.098	0.019	0.105	0.196	0.189	0.123	0.083
H	0.046	0.064	0.071	0.148	0.051	0.266	0.347	0.468	0.433	0.166	1.498	0.000

注:表中数值为以空白对照(H12)调零后,测得的 A450 值。数值大于 0.210 判定为阳性结果,小于 0.210 判定为阴性结果。其中,A1~B10 为 22 份 HSV-1⊕ & HSV-2⊕ 对照血清; B11~F9 为 47 份 HSV-1⊕ & HSV-2⊖ 对照血清; F10~H5 为 20 份 HSV-1⊖ & HSV-2⊖ 对照血清; H6~H10 为 5 份 HSV-1⊖ & HSV-2⊕ 对照血清; H11 为阳性对照; H12 为空白对照。

(下转第 4789 页)

生物膜。

表 1 茶树精油对成熟铜绿假单胞杆菌生物膜抑制作用 (存活细菌菌落数×10³/ml)

组别	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
对照组	420	330	660	512	443	566
茶树精油 (μg/ml)						
4.8	92	74	62	60	51	50
9.6	52	45	30	28	15	12
19.2	10	5	1	0.6	0	0
28.8	0	0	0	0	0	0

3 讨论

细菌在自然界中以生物膜的形式存在,以抵抗外界的有害环境,加上广谱抗生素的泛滥使用,导致多种抗生素对它束手无策,这也是一些常见的顽固慢性疾病难以治愈的原因^[8]。本研究观察了茶树精油对铜绿假单胞杆菌及其生物膜的抑菌能力,结果表明,茶树精油对铜绿假单胞杆菌悬浮菌液的最小抑菌浓度(MIC)为 9.6 μg/ml,与杜光等研究茶树精油抗菌作用的报道相符^[9]。对茶树精油抑制铜绿假单胞杆菌生物膜的观察结果则表明,与对照组比较,茶树精油 MIC 为 0.5 倍(4.8 μg/ml)与 1 倍(9.6 μg/ml)时,虽然能一定程度上抑制生物膜,但长时间作用亦不能完全清除生物膜,表明细菌生物膜比其悬浮菌更具有耐药抵抗性。茶树精油 MIC 为 2 倍(19.2 μg/ml)作用 20 h 后,细菌生物膜可完全消失,茶树精油 MIC 为

3 倍时(28.8 μg/ml),则可在短时间内(4 h)完全杀灭细菌生物膜,表明茶树精油对铜绿假单胞杆菌生物膜有完全清除效应,可抑制细菌生物膜形成,但需要进一步研究论证。

参考文献

[1] 陶凤云,张新妙,俞军,等.茶树油抗菌作用机理研究进展[J].中国抗生素杂志,2006,31(5):261-266.
 [2] Brophy J J, Davies N W, Southwell I A, et al. Gas chromatographic quality control for oil of Melaleuca terpinen-4-ol type (Australian tea tree) [J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 1330.
 [3] 张咏梅,陈以旺.铜绿假单胞菌生物膜耐药性研究进展[J].海峡药学,2004,16(2):10-11.
 [4] 黄晓敏,柯野,林良佳,等.溪黄草复方对金黄色葡萄球菌生物膜影响[J].中国公共卫生,2007,23(11):1350-1357.
 [5] 程惠娟,官妍,汤华阳,等.百肤青抗绿脓单胞菌生物膜的作用[J].安徽中医学院学报,2004,23(5):30-32.
 [6] National Committee Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. NCCLS, 2004. 1-159.
 [7] Hoiby N, Krogh J H, Moser C, et al. Pseudomonas aeruginosa and the in vitro and in vitro biofilm mode of growth [J]. Microbes Infect, 2001, 3(1): 23-26.
 [8] 于睿莉,董震.生物膜在慢性鼻-鼻窦炎发病机制中的应用[J].中华耳鼻咽喉头颈外科杂志,2006,41(3):20-26.
 [9] 杜光,郑恒,宗凯.茶树油化学成分及抗菌作用研究[J].中国医院药学杂志,2004,24(8):462-463.

收稿日期:2011-05-30

(上接第 4786 页)

3 讨论

经鉴定,纯化的 GST/gG-2 融合蛋白以 81.48% 的较高灵敏性和 92.54% 的高特异性,很好的与相应对照血清发生反应。初步证明,虽然原核表达系统在蛋白表达后期缺乏糖基化、磷酸化等修饰过程,表达蛋白与天然蛋白的构象差距往往较大,生物学活性难以较好地保存^[11],但我们表达的 GST/gG-2 融合蛋白却很好地保留了 gG-2 天然蛋白相应的生物活性,且融合蛋白中 GST 的存在对检测结果无影响(GST 蛋白与所有对照血清均无非特异性反应)。

GST/gG-2 融合蛋白的获得,不仅对提高目前 HSV-2 免疫学检测的灵敏性和特异性具有重要实用价值,同时对研制 HSV-2 基因工程疫苗也具有指导意义。接下来,我们仍将继续加大对对照血清样本量,对重组蛋白进行更广泛的活性鉴定,以期最终开发出以重组蛋白代替传统的全病毒作为检测抗原的实用型 HSV-2 型特异性免疫学检测试剂盒。

参考文献

[1] 黄涛,严华.单纯疱疹病毒包膜糖蛋白的结构及功能研究[J].微生物学免疫学进展,2009,37(3):59-62.
 [2] Liljeqvist JA, Svennerholm B, Bergstrom T. Conservation of type-specific B-cell epitopes of glycoprotein G in clinical herpes simplex virus type 2 isolates [J]. Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4517-4522.

[3] Liljeqvist JA, Trybala E, Svennerholm B, et al. Localization of type-specific epitopes of herpes simplex virus type 2 glycoprotein G recognized by human and mouse antibodies [J]. Gen Virol, 1998, 79(5): 1215-1224.
 [4] Grabowska AC, Jameson P, Laing S, et al. Identification of type specific domains within glycoprotein G of herpes simplex virus type 2 (HSV-2) recognized by the majority of patients infected with HSV-2, but not by those infected with HSV-1 [J]. Gen Virol, 1999, 80: 1789-1798.
 [5] 郑秀峰,韩金祥.单纯疱疹病毒研究现状[J].中国麻风皮肤病杂志,2008,24(5):370-373.
 [6] Parker JN, Pfister LA, Quenelle D, et al. Genetically engineered herpes simplex viruses that express IL-12 or GM-CSF as vaccine candidates [J]. Vaccine, 2006, 24(10): 1644-1652.
 [7] 刘莉,于爱莲.单纯疱疹病毒 2 型疫苗的研究进展[J].泰山医学院学报,2009,130(110):804-808.
 [8] 黄涛,严华,龚文波,等.单纯疱疹病毒 1 型糖蛋白 G 表达载体的构建及鉴定[J].现代预防医学,2010,38(3):529-532.
 [9] 陆健.蛋白质纯化技术及应用[M].北京:化学工业出版社,2005.12-15.
 [10] 吴乃虎.基因工程原理(下册)[M].北京:科学出版社,2001.142-143.
 [11] 王正茂,李琳,管文燕,等.单纯疱疹病毒 I 型糖蛋白 D 胞外区的真核表达及生物学活性分析[J].生物工程学报,2010,26(5):657-663.

收稿日期:2011-04-30